

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 8 月 19 日 (19.08.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/069295 A1(51) 国際特許分類⁷: A61L 27/38, C12N 5/00, 11/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/001274

(22) 国際出願日: 2004 年 2 月 6 日 (06.02.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-068899 2003 年 2 月 6 日 (06.02.2003) JP
特願2003-079100 2003 年 2 月 14 日 (14.02.2003) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 岡野 光夫 (OKANO, Teruo) [JP/JP]; 〒2720827
千葉県市川市国府台 6-12-12 Chiba (JP). 西田
幸二 (NISHIDA, Kohji) [JP/JP]; 〒5670031 大阪府茨木
市春日 1-16-53-602 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大和 雅之 (YAM-
ATO, Masayuki) [JP/JP]; 〒1580097 東京都世田谷区用
賀 2-28-16 Tokyo (JP).(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒
1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大
手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo
(JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: CELL SHEETS FOR ECTOCORNEA FORMATION, METHOD OF PRODUCING THE SAME AND METHOD OF
USING THE SAME

(54) 発明の名称: 角膜上皮形成用細胞シート、それらの製造方法及びそれらの利用方法

(57) Abstract: It is intended to provide a cell sheet for ectocornea formation favorably sticking to an anterior eye tissue. This object can be achieved by producing a cell sheet for ectocornea formation by culturing cells for ectocornea formation under specific conditions on a cell culture support having a base coated with a temperature-responsive polymer the hydration force of which changes within a temperature range of from 0 to 80°C, multilayering the cultured cell layers if necessary, and then: (1) controlling the temperature of the liquid culture medium to a level higher than the upper critical dissolution temperature or lower than the lower critical dissolution temperature; (2) closely sticking the thus cultured cells for ectocornea formation to the carrier; and (3) stripping off as such together with the carrier under specific conditions.

(57) 要約: 本発明は、前眼部組織への付着性が良好な角膜上皮形成用細胞シートを提供することを課題とする。これに対して、0~80°Cの温度範囲で水和力に変化する温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で角膜上皮形成用細胞を特定の条件で培養し、必要により培養細胞層を重層化させ、その後(1)培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、(2)培養した角膜上皮形成用細胞をキャリアに密着させ、(3)そのままキャリアと共に特定の条件下で剥離することによって角膜上皮形成用細胞シートを製造することにより、上記課題を解決するに至った。

WO 2004/069295 A1

明細書

角膜上皮形成用細胞シート、それらの製造方法及びそれらの利用方法

発明の属する技術分野

- 5 本発明は、生物学、医学等の分野における角膜上皮形成用細胞シート、製造方法及びそれらを利用した治療法に関する。

背景技術

- 医療技術の著しい発展により、近年、治療困難となった臓器を他人の臓器と置き換えようとする臓器移植が一般化してきた。対象となる臓器も皮膚、角膜、腎臓、肝臓、心臓等と実に多様で、また、術後の経過も格段に良くなり、医療の一技術としてすでに確立されつつある。一例として角膜移植をあげると、約40年前に日本にもアイバンクが設立され移植活動が始められた。しかしながら、未だにドナー数が少なく、国内だけでも角膜移植の必要な患者が年間約2万人出てくるのに対し、実際に移植治療が行える患者は約1/10の2000人程度でしかないといわれている。角膜移植というほぼ確立された技術があるにもかかわらず、ドナー不足という問題のため、次なる医療技術が求められているのが現状である。

- このような背景のもと、以前より、人工代替物や細胞を培養して組織化させたものをそのまま移植しようという技術が注目されている。その代表的な例として、人工皮膚及び培養皮膚があげられよう。しかしながら、合成高分子を用いた人工皮膚は拒絶反応等が生じる可能性があり、移植用皮膚としては好ましくない。一方、培養皮膚は本人の正常な皮膚の一部を所望の大きさまで培養したものであるため、これを使用しても拒絶反応等の心配がなく、最も自然なマスキング剤と言える。

- 25 従来、そのような細胞培養は、ガラス表面上あるいは種々の処理を行った合成高分子の表面上にて行われていた。例えば、ポリスチレンを材料とする表面処理、例えばγ線照射、シリコーンコーティング等を行った種々の容器等が細胞培養用容器として普及している。このような細胞培養用容器を用いて培養・増殖した細胞は、トリプシンのような蛋白分解酵素や化学薬品により処理することで容器表

面から剥離・回収される。

しかし、上述のような化学薬品処理を施して増殖した細胞を回収する場合、処理工程が煩雑になり、不純物混入の可能性が多くなること、及び増殖した細胞が化学的処理により変成若しくは損傷し細胞本来の機能が損なわれる例があること

5 等の欠点が指摘されていた。かかる欠点を克服するために、これまでいくつかの技術が提案されている。

特公平 2-23191 号公報には、ヒト新生児由来角化表皮細胞を、ケラチン組織の膜が容器の表面上に形成される条件下にて、培養容器中で培養し、ケラチン組織の膜を酵素を用いて剥離させることを特徴とするケラチン組織の移植可能な膜を製造する方法、が記載されている。具体的には、3T3細胞をフィーダーレイヤーとして増殖、重層化させ、蛋白質分解酵素であるディスパーゼを用いて細胞シートを回収する技術が開示されている。しかしながら、当該公報に記載されている方法は次のような欠点を有していた。

15 (1) ディスパーゼは菌由来のものであり、回収された細胞シートを十分に洗浄する必要があること。

(2) 培養された細胞ごとにディスパーゼ処理の条件が異なり、その処理に熟練が必要であること。

(3) ディスパーゼ処理により培養された表皮細胞が病理学的に活性化されること。

20 (4) ディスパーゼ処理により細胞外マトリックスが分解されること。

(5) そのためその細胞シートを移植された患部は感染され易いこと。

上述したような従来法の欠点に加えて、本発明の対象とする角膜上皮細胞、角膜内皮細胞、及び結膜上皮細胞などの前眼部関連細胞は、皮膚細胞ほど細胞・細胞間の結合が強くないため、上記ディスパーゼをもってしても、培養後、1枚のシートとして剥離、回収することはできなかった、という欠点を有していた。

かかる課題を解決するために、最近、スポンジ層と上皮層を除去した羊膜上で、角膜上皮細胞や結膜上皮細胞を培養、組織化させ、その羊膜ごと移植用細胞片とする技術が考案された(特開 2001-161353 号)。羊膜は、十分な膜強度を持っていること、さらに抗原性を持っていないことから、移植用細胞片の支持

体として好都合だが、羊膜というものがもともと眼内になく、より精密に眼内組織を構築していくためには、やはり眼内の細胞だけで十分な強度を持ったシートを作製し、そのシートが角膜実質組織と直接接することが望まれていた。

また、特願 2 0 0 1 - 2 2 6 1 4 1 号では、水に対する上限もしくは下限臨界溶解温度が 0 ~ 8 0 ℃である温度応答性ポリマーを基材表面に被覆した細胞培養支持体上で前眼部関連細胞を培養し、必要に応じて常法により培養細胞層を重層化させ、支持体の温度を変えるだけで培養した細胞シートを剥離させることで、十分な強度を持った細胞シートの作製が可能となった。また、この細胞シートには基底膜様蛋白質も保持しており、上述したデイスパーゼ処理したものに比べ、組織への生着性も明らかに改善されている。しかしながら、実際の患者の負担軽減を考えると、その生着性にさらに改善が望まれていた。

さらに、最近、医療現場においてもさまざまな方法が提案されている。たとえば、WO 9 8 / 3 1 3 1 6 においては近視治療のために P R K 法、L A S I K 法を行う際、培養した角膜上皮細胞シートを利用する技術が提案されている。しかしながら、ここでの培養角膜上皮シートは、上述のデイスパーゼによって剥離されたものであり、レーザーで削られた角膜組織への付着性が悪く、顕著な治療効果も望めないという問題点があった。

また、2 0 0 1 年 5 月 1 0 日付け毎日新聞記事において、角膜疾患の患者に対し、角膜の代わりに培養口腔粘膜を貼り、患者の角膜再生を促す技術が提案されている。しかしながら、ここでの培養口腔粘膜は、上述のデイスパーゼによって剥離されたものであり、患者への角膜組織への付着性が悪く、顕著な治療効果も望めないという問題点があった。

本発明は、上記のような従来技術の問題点を解決することを意図してなされたものである。すなわち、本発明は、前眼部組織への付着性が良好な角膜上皮形成用細胞シートを提供することを目的とする。また、本発明は、その製造法、並びに利用方法を提供することを目的とする。

発明の概要

本発明者らは、上記課題を解決するために、種々の角度から検討を加えて、研

究開発を行った。その結果、温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した特定条件の細胞培養支持体上で角膜上皮形成用細胞を特定条件下で培養し、その後、培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、培養した角膜上皮形成用細胞シートを特定のキャリアに密着させ、細胞シートの収縮を抑えながら、そのままキャリアと共に剥離することにより、生体組織に極めて付着性の良い角膜上皮形成用細胞シートが得られることを見いだした。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は、前眼部組織への付着性が良好な、キャリアに密着させた、角膜上皮形成用細胞シートを提供する。

10 また、本発明は、0～80℃の温度範囲で水和力が変化する温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で角膜上皮形成用細胞を培養し、必要に応じて常法により培養細胞層を重層化させ、その後、

(1) 培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、

(2) 培養した角膜上皮形成用細胞をキャリアに密着させ、

15 (3) そのままキャリアと共に剥離する

ことを特徴とする、生体組織に極めて付着性の良い角膜上皮形成用細胞シートの製造方法を提供する。

加えて、本発明は、深部まで欠損及び／または創傷した組織を治療するための生体組織に極めて付着性の良い上記角膜上皮形成用細胞シートを提供する。

20 更に加えて、本発明は、深部まで欠損及び／または創傷した組織に対し、生体組織に極めて付着性の良い上記角膜上皮形成用細胞シートを移植することの特徴とする治療法を提供する。

更に、本発明は医療分野のみならず、化学物質、毒物、或いは医薬品の安全性評価用細胞として有用な角膜上皮形成用細胞シートを提供する。

25

発明の実施の形態

上述したように、本発明はキャリアに密着させた、角膜上皮形成用細胞シートを提供する。本発明において、角膜上皮形成用細胞シートという場合、角膜上皮細胞から形成される再生角膜上皮細胞シート、もしくは角膜上皮細胞以外の細胞

から形成される角膜上皮代替細胞シートを含む。

本発明の角膜上皮形成用細胞シートとして再眼角膜上皮細胞シートを使用する場合、使用される好適な細胞として角膜上皮細胞、及びその幹細胞が挙げられるが、その種類は、何ら制約されるものではない。

- 5 また、本発明の角膜上皮形成用細胞シートとして角膜上皮代替細胞シートを使用する場合、使用される好適な細胞として、たとえば、頬膜、歯肉に存在する口腔粘膜細胞、毛根細胞、結膜上皮細胞の何れかもしくは2者以上の混合物、或いはこれらと角膜上皮細胞との混合物が挙げられるが、その種類は、何ら制約されるものではない。これらの細胞シート等を作製する際に、角膜上皮代替細胞の培養中に特別な添加物を添加することは必要なく、例えば口腔粘膜細胞を角膜上皮代替細胞として使用する場合には、口腔粘膜細胞の標準的な細胞培養方法を用いて培養し、細胞培養シート等を作製することができる。
- 10

- 本発明の文脈において、角膜上皮形成用細胞シートは、単層シートの状態であっても、重層化シートの状態であってもよい。したがって、再眼角膜上皮細胞シートという場合、再眼角膜上皮細胞の単層シートまたは重層化シートを含み、角膜上皮代替細胞シートという場合、角膜上皮代替細胞の単層シートまたは重層化シートを含む。すなわち、角膜上皮形成用細胞シートは、再眼角膜上皮細胞または角膜上皮代替細胞の、単層シートまたは重層化シートのいずれであってもよい。
- 15

- 本発明において、再眼角膜上皮細胞シートとは、上記した各種細胞が培養支持体上で単層状に培養され、その後、支持体より剥離されたシートを意味し、その重層化シートとは、その再眼角膜上皮細胞シートが単独若しくは他の細胞からなるシートと組み合わせられた状態で重層化されたシートを意味する。
- 20

- また、本発明において、角膜上皮代替細胞シートとは、上記した各種細胞が培養支持体上で単層状に培養され、その後、支持体より剥離されたシートを意味し、その重層化シートとは、その角膜上皮代替細胞シートが単独若しくは他の細胞からなるシートと組み合わせられた状態で重層化されたシートを意味する。
- 25

本発明における角膜上皮形成用細胞シートは培養時にディスパーゼ、トリプシン等で代表される蛋白質分解酵素による損傷を受けていないものである。そのため、基材から剥離された角膜上皮形成用細胞シートは、細胞－細胞間のデスモソ

ーム構造が保持され、構造的欠陥が少なく、強度の高いものである。また、本発明のシートは培養時に形成される細胞－基材間の基底膜様蛋白質も酵素による破壊を受けていない。このことにより、移植時において患部の生体組織と良好に接着することができ、効率良い治療を実施することができるようになる。このような生体組織に対してきわめて付着性が高いという性質を有することを、本発明において「高付着性」という。

以上のことを具体的に説明すると、トリプシン等の通常の蛋白質分解酵素を使用した場合、細胞－細胞間のデスモソーム構造及び細胞、基材間の基底膜様蛋白質等は殆ど保持されておらず、従って、細胞は個々に分かれた状態となって剥離される。その中で、蛋白質分解酵素であるディスパーゼに関しては、細胞－細胞間のデスモソーム構造については10～60%保持した状態で剥離させることができることで知られているが、細胞－基材間の基底膜様蛋白質等を殆ど破壊してしまうため、得られる細胞シートは強度の弱いものである。これに対して、本発明の細胞シートは、デスモソーム構造、基底膜様蛋白質が80%以上残存された状態のものであり、上述したような種々の効果を得ることができるものである。したがって、上述した「高付着性」は、構造的にはデスモソーム構造および／または基底膜様蛋白質が80%以上残存された状態のものをいう。

本発明における角膜上皮形成用細胞シートは生体組織である前眼部組織に極めて良好に生着する；すなわち、「高付着性」である。その性質が実現されるための要因としては、支持体表面から剥離させた再生角膜上皮細胞シートまたはその重層化シートの収縮を抑えることも必要であることを見いだした。その際、角膜上皮形成用細胞シートの収縮率はシート内の何れかの方向における長さにおいても20%以下であることが望ましく、好ましくは10%以下、さらに好ましくは5%以下であることが好ましい。シートの何れかの方向の長さにおいて20%以上となると、剥離した細胞シートはたるんでしまい、その状態で生体組織に付着させても組織に密着させられず、本発明で示すところの「高生着性」は望めない。

角膜上皮形成用細胞シートの収縮を抑制する方法は、細胞シートを収縮させない限りにおいて何ら方法的に制約されるものではないが、例えば、支持体から角膜上皮形成用細胞シートを剥離させる際、これらの細胞シートに中心部を切り抜

いたリング状のキャリアなどを密着させ、そのキャリアごと細胞シートを剥離する方法などが挙げられる。

角膜上皮形成用細胞シートを密着させる際に使用するキャリアは、本発明の細胞シートが収縮しないように保持するための構造物であり、例えば高分子膜または高分子膜から成型された構造物、金属性治具などを使用することができる。例えば、キャリアの材質として高分子を使用する場合、その具体的な材質としてはポリビニリデンジフルオライド（PVDF）、ポリプロピレン、ポリエチレン、セルロース及びその誘導体、紙類、キチン、キトサン、コラーゲン、ウレタン等を挙げるができる。

10 本発明において密着という場合、細胞シートが収縮しないように、細胞シートとキャリアとの境界面において、キャリア上で細胞シートがずれたり移動したりしない状態のことをいい、物理的に結合することにより密着していても、両者のあいだに存在する液体（例えば培養液、その他の等張液）を介して密着していてもよい。

15 キャリアの形状は、特に限定されるものではないが、例えば得られた角膜上皮形成用細胞シートを移植する際に、キャリアの一部に移植部位と同程度もしくは移植部位より大きく切り抜いたものを利用すると、細胞シートは切り抜かれたの周囲の部分だけに固定され、切り抜かれた部分にある細胞シートを移植部位に当てただけで良く、好都合である。

20 また、本発明の細胞シートは、支持体表面上に角膜上皮形成用細胞を播種後、培養することで得られるが、支持体表面上で細胞がコンフルエント（満杯な状態）に到達してから21日以下、好ましくは15日以下、さらに10日以下であることが好ましい。細胞がコンフルエント（満杯な状態）に到達してから21日より多いと、剥離した角膜上皮形成用細胞シートの最下層の細胞の活性が低下し、そのため付着性も低減してしまい、本発明の特徴である「高生着性」は望めなくなる。

25 本発明の角膜上皮形成用細胞シートを、例えば、角膜びらん、角膜潰瘍などの前眼部組織の一部或いは全部を損傷もしくは欠損した患部などの他、角膜上皮細胞を持っていない両眼性の難治性角結膜疾患を治療する際に使用することができ

る。本発明の前眼部組織とは、前眼部であれば特に限定されるものではないが、一般には、角膜上皮組織、ボーマン組織、角膜実質組織などが挙げられる。ここで難治性角結膜疾患という場合、例えばS t e v e n s - J o h n s o n症候群、眼類天疱瘡、熱傷、アルカリ腐蝕、酸腐蝕の様な疾患が含まれる。

- 5 本発明における角膜上皮形成用細胞シートは、以上に示すように、生体組織である前眼部組織に極めて良好に付着できる細胞シートであり、従来技術からでは全く得られなかったものである。

本発明はまた、以下の製造方法により上述した本発明の角膜上皮形成用細胞シートを作製する方法もまた、提供する。すなわち、0～80℃の温度範囲で水和
10 力が変化する温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で角膜上皮形成用細胞を培養し、必要に応じて常法により培養細胞層を重層化させ、その後、

- (1) 培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、
(2) 培養した角膜上皮形成用細胞をキャリアに密着させ、
15 (3) そのままキャリアと共に剥離する

ことを特徴とする、角膜上皮形成用細胞シートの製造方法を提供する。このような方法で得られた角膜上皮形成用細胞シートは、生体組織に対して「高付着性」であるという特徴を有する。

細胞培養支持体において基材の被覆に用いられる温度応答性ポリマーは、0～
20 80℃、より好ましくは20℃～50℃の温度範囲で水和力が変化することを特徴としている。このような温度応答性ポリマーの一態様として、水溶液中で上限臨界溶解温度または下限臨界溶解温度0℃～80℃、より好ましくは20℃～50℃を有するものが挙げられる。80℃を越えると細胞が死滅する可能性がある
ので好ましくない。また、0℃より低いと一般に細胞増殖速度が極度に低下する
25 か、または細胞が死滅してしまうため、やはり好ましくない。

本発明においては、細胞培養支持体上から角膜上皮形成用細胞シートを剥離する際に、低温処理することが好ましい。本発明における低温処理として好ましい温度条件は0℃～30℃であり、好ましい処理時間は2分～1時間であるが、これらの温度及び時間に限定されない。好ましい条件の一例として、低温処理は2

0℃で30分インキュベートという条件を使用することができる。

本発明に用いる温度応答性ポリマーはホモポリマー、コポリマーのいずれであってもよい。このようなポリマーとしては、例えば、特開平2-211865号公報に記載されているポリマーが挙げられる。具体的には、例えば、以下のモノ
5 マーの単独重合または共重合によって得られる。使用し得るモノマーとしては、例えば、(メタ)アクリルアミド化合物、N- (若しくはN, N-ジ) アルキル置換 (メタ) アクリルアミド誘導体、またはビニルエーテル誘導体が挙げられ、コ
ポリマーの場合は、これらの中で任意の2種以上を使用することができる。更には、上記モノマー以外のモノマー類との共重合、ポリマー同士のグラフトまたは
10 共重合、あるいはポリマー、コポリマーの混合物を用いてもよい。また、ポリマー本来の性質を損なわない範囲で架橋することも可能である。

被覆を施される基材としては、通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の化合物を初めとして、一般に形態付与が可能である物質、例えば、上記以外のポリマー化合物、セラミックス類な
15 ど全て用いることができる。

温度応答性ポリマーの支持体への被覆方法は、特に制限されないが、例えば、特開平2-211865号公報に記載されている方法に従ってよい。すなわち、かかる被覆は、基材と上記モノマーまたはポリマーを、電子線照射 (EB)、 γ 線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理、有機重合反応のいずれかにより、
20 または塗布、混練等の物理的吸着等により行うことができる。

温度応答性ポリマーの被覆量は、 $0.4 \sim 4.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲が良く、好ましくは $0.7 \sim 3.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、さらに好ましくは $0.9 \sim 3.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。 $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ より少ない被覆量るとき、刺激を与えても当該ポリマー上の細胞は剥離し難く、作業効率が著しく悪くなり好ましくない。
25 い。逆に $4.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上であると、その領域に細胞が付着し難く、細胞を十分に付着させることが困難となる。

本発明における支持体の形態は特に制約されるものではないが、例えばディッシュ、マルチプレート、フラスコ、セルインサートなどが挙げられる。その中で、特にセルインサートについては、例えば角膜上皮細胞を重層化させる際に必要な

3 T 3 フィーダー細胞を角膜上皮細胞と分けて培養できるため好都合である。その際、角膜上皮細胞はセルインサート側にあっても、セルインサートが装着されるディッシュ側にあっても良く、少なくとも角膜上皮細胞が培養される表面には温度応答性ポリマーが被覆されている必要性がある。

- 5 本発明において、細胞の培養は上述のようにして製造された細胞培養支持体上で行われる。培地温度は、基材表面に被覆された前記ポリマーが上限臨界溶解温度を有する場合はその温度以下、また前記ポリマーが下限臨界溶解温度を有する場合はその温度以上であれば特に制限されない。しかし、培養細胞が増殖しないような低温域、あるいは培養細胞が死滅するような高温域における培養が不適切
- 10 であることは言うまでもない。温度以外の培養条件は、常法に従えばよく、特に制限されるものではない。例えば、使用する培地については、公知のウシ胎児血清（FCS）等の血清が添加されている培地でもよく、また、このような血清が添加されていない無血清培地でもよい。

- 本発明の方法において、培養した細胞を支持体材料から剥離回収するには、培養された角膜上皮形成用細胞をキャリアに密着させ、細胞の付着した支持体材料の温度を支持体基材の被覆ポリマーの上限臨界溶解温度以上若しくは下限臨界溶解温度以下にすることによって、そのままキャリアとともに剥離することができる。なお、細胞シートを剥離することは細胞を培養していた培養液中において行うことも、その他の等張液中において行うことも可能であり、目的に合わせて選
- 15 択することができる。

- 本発明では、細胞シートを患部に当てた後、細胞シートをキャリアからはがせば良い。そのはがし方は、何ら制約されるものではないが、例えば、キャリアを濡らしてキャリアと細胞シートの密着性を弱めてはがす方法、或いはメス、はさみ、レーザー光、プラズマ波などの治具を用いても切断する方法でも良い。例え
- 20 ば上述したような一部を切り抜いたキャリアに密着した細胞シートを用いた場合、レーザー光などを用いて患部の境界線に沿って切断すると患部以外の余計なところへの細胞シートの付着を避けられ好都合である。

本発明の角膜上皮形成用細胞シートと生体組織との固定方法は特に限定されるものではなく、細胞シートと生体組織を縫合しても良く、或いは本発明の角膜上

皮形成用細胞シートは生体組織と速やかに生着するため、患部に付着させた細胞シートは生体側と縫合しなくても良い。特に後者の場合、移植した細胞シートを保護する意味でコンタクトレンズを併用しても良い。

本発明の一態様である重層化シートの製造法は特に限定されるものではないが、

- 5 例えば、一般的に知られている 3 T 3 細胞をフィーダーレイヤーとして増殖、重層化させる方法、或いは上記のキャリアに密着した角膜上皮形成用細胞シートを利用することで製造する方法等を挙げることができる。具体的には、次のような方法が例示される。

- 10 (1) キャリアと密着した細胞シートを細胞培養支持体に付着させ、その後培地を加えることでキャリアを細胞シートからはがし、そして更に別のキャリアと密着した細胞シートを付着させることを繰り返すことで細胞シートを重層化させる方法。

- 15 (2) キャリアと密着した細胞シートを反転させ細胞培養支持体上でキャリア側で固定させ、細胞シート側に別の細胞シートを付着させ、その後培地を加えることでキャリアを細胞シートからはがし、再び別の細胞シートを付着させる操作を繰り返すことで細胞シートを重層化させる方法。

- (3) キャリアと密着した細胞シート同士を細胞シート側で密着させる方法。

- (4) キャリアと密着した細胞シートを生体の患部に当て、細胞シートを生体組織に付着させた後、キャリアをはがし、再び別の細胞シートを重ねていく方法。

- 20 本発明における重層化シートは、必ずしも角膜上皮形成用細胞だけからなるものでなくても良い。例えば、角膜上皮形成用細胞シートの一形態である角膜上皮細胞シートと同様に操作して作製した角膜内皮細胞シート及び／または結膜上皮細胞シートを重ね合わせることも可能である。生体内の前眼部組織により近いものとする上でこのような技術は極めて有効である。

- 25 角膜上皮形成用細胞シートを高収率で剥離、回収する目的で、細胞培養支持体を軽くたたいたり、ゆらしたりする方法、更にはピペットを用いて培地を攪拌する方法等を単独で、あるいは併用して用いてもよい。加えて、必要に応じて培養細胞は等張液等で洗浄して剥離回収してもよい。

本発明に示される角膜上皮形成用細胞シートの用途は何ら制約されるものでは

ないが、例えば上述したように、角膜びらん、角膜潰瘍などの前眼部組織の一部
或いは全部を損傷もしくは欠損した患部などの他、角膜上皮細胞を持っていない
両眼性の難治性角結膜疾患などの治療に有効である。或いは本発明に示される角
膜上皮形成用細胞シートは、エキシマレーザーを中央部に照射して角膜表面を削
5 り、角膜の屈折力を減少させて近視を矯正するピーアールケー（PRK）法、マ
イクロケラトームによって160 μ mの厚さで角膜実質層を切断しフラップを作
製した後、フラップをめくり、エキシマレーザーで角膜実質層を削り取り、表面
を整え、最後にフラップを元の位置に戻すレーシック（LASIK）法、アルコ
ールを点眼し角膜表面を柔らかくし、マイクロケラトームを使わずに角膜上皮の
10 50 μ mの厚さで切除してフラップを作製し、エキシマレーザーで角膜実質層を
削り取り、表面を整え、最後にフラップを元の位置に戻すレーゼック（LASE
K）法などの屈折矯正に有効である。

上述の方法により得られた角膜上皮形成用細胞シートは、従来の方法により得
られたものに比べて、剥離の際の非侵襲性の点で極めて優れており、移植用角膜
15 等の臨床応用が強く期待される。特に、本発明の角膜上皮形成用細胞シートは従
来の移植シートとは異なり、生体組織との高い生着性を有するため、極めて速く
生体組織に生着する。このことは、患部の治療効率の向上、更には患者の負担の
軽減もはかられ極めて有効な技術と考えられる。なお、本発明の方法において使
用される細胞培養支持体は繰り返し使用が可能である。

20

実施例

以下に、本発明を実施例に基づいて更に詳しく説明するが、これらは本発明を
何ら限定するものではない。

実施例1

25 市販の6ウェル用セルインサート（ベクトン・ディッキンソン・ラブウェア（B
ecton Dickinson Labware）社製 ファルコン（FALC
ON）3090）上に、N-イソプロピルアクリルアミドモノマーを30%にな
るようにイソプロピルアルコールに溶解させたものを0.08ml塗布した。0.
25MGyの強度の電子線を照射し、培養皿表面にN-イソプロピルアクリルア

ミドポリマー（P I P A A m）を固定化した。照射後、イオン交換水により培養皿を洗浄し、残存モノマーおよび培養皿に結合していないP I P A A mを取り除き、クリーンベンチ内で乾燥し、エチレンオキサイドガスで滅菌することで細胞培養支持体材料を得た。基材表面における温度応答性ポリマー量を測定したところ、

5 1. $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 被覆されていることが分かった。

得られた細胞培養支持体材料上にて、常法により正常ウサギ角膜上皮細胞を培養した（使用培地：コルネパック（クラボウ（株）製）、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下）。その結果、角膜上皮細胞は、細胞培養支持体材料上に正常に付着し、増殖した。

10 培養7日後に培養した細胞はコンフルエントの状態となり、さらに7日間培養した細胞の上に直径1.5 cmの円状に切り抜いた直径2.1 cmのポリビニリデンジフルオライド（P V D F）膜から成型したキャリアをかぶせ、培地を静かに吸引し、細胞培養支持体材料ごと 20°C で30分インキュベートし冷却することで低温処理し、細胞培養支持体材料上の細胞もかぶせたキャリアと共に剥離させられた。得られた細胞シートは収縮率5%以下の1枚のシートとして十分に強度を持ったものであった。

20 本実施例で得られた角膜上皮細胞シートを角膜上皮組織部が欠損した角膜びらん疾病モデルであるウサギに常法に従い移植した。角膜上皮細胞シートを創傷部へ15分間付着させ、その後、メスを用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。3週間後、患部を観察したところ、角膜上皮細胞シートは眼球に良好に生着していた。

実施例 2

25 本実施例においては、N-イソプロピルアクリルアミドモノマーを35%になるようにイソプロピルアルコールに溶解させた以外は、実施例1と同様の方法を使用して、培養皿表面にN-イソプロピルアクリルアミドポリマー（P I P A A m）を固定化した。この方法で形成した基材表面における温度応答性ポリマー量を測定したところ、1. $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 被覆されていることが分かった。

本実施例においても、実施例1と同様に、角膜上皮細胞は細胞培養支持体材料上に正常に付着・増殖し、培養7日後に培養した細胞はコンフルエントの状態と

なった。さらに7日間培養した細胞の上に直径1.5cmの円状に切り抜いた直径2.1cmのポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜から成型したキャリアをかぶせ、培地を静かに吸引し、細胞培養支持体材料ごと20℃で30分インキュベートし冷却することで低温処理し、細胞培養支持体材料上の細胞もかぶ
5 せたキャリアと共に剥離させられた。得られた細胞シートは収縮率5%以下の1枚のシートとして十分に強度を持ったものであった。

本実施例で得られた角膜上皮細胞シートを角膜上皮組織部が欠損した角膜びらん疾病モデルであるウサギに常法に従い移植した。角膜上皮細胞シートを創傷部へ15分間付着させ、その後、メスを用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わず、移植後、患部にコ
10 ンタクトレンズを装着させた。3週間後、患部を観察したところ、角膜上皮細胞シートは眼球に良好に生着していた。

実施例 3

15 実施例1の細胞培養支持体上で、培地をマイトマイシンCを含む通常のグリーンらの培地(DMEM+AB(フィーダーレイヤー作製用)、ヒト新生児由来角化表皮細胞用)に変更する以外は同様な方法で正常ウサギ角膜上皮細胞を培養させた。その結果、培養支持体材料上の角膜上皮細胞は正常に付着し、増殖した。

培養6日後にコンフルエントな状態となり、さらに6日間培養して重層化させた。次に、直径1.5cmの円状に切り抜いた直径2.1cmのポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜から成型したキャリアをかぶせ、培地を静かに吸引し、細胞培養支持体材料ごと20℃で30分インキュベートし冷却することで低温処理し、細胞培養支持体材料上の重層化角膜上皮細胞シートをかぶせたキャリアと共に剥離させられた。剥離された重層化シートは収縮率5%以下の1枚の
20 シートとして十分に強度を持ったものであった。

本実施例で得られた角膜上皮細胞重層化シートを角膜上皮組織部が欠損した角膜びらん疾病モデルであるウサギに常法に従い移植した。角膜上皮細胞シートを創傷部へ15分間付着させ、その後、レーザー光を用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。

3週間後、患部を観察したところ、角膜上皮細胞重層化シートは眼球に良好に生着していた。

比較例 1

- 5 実施例 1 で角膜上皮細胞シートを作製し、キャリアを使わずに細胞シートを剥離させ、収縮させること以外は実施例 1 と同様に角膜上皮細胞シートを製造した。その際の収縮率は、42%であった。

実施例 1 と同様に得られた角膜上皮細胞シートを角膜上皮組織部を欠損させたウサギに常法に従い移植した。角膜上皮細胞シートを創傷部へ15分間付着させ、
10 その後、メスを用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。移植1日後に患部を観察したところ、角膜上皮細胞シートの眼球への生着性は悪く、患部より脱落しかけていた。

比較例 2

- 15 実施例 3 で角膜上皮細胞重層化シートを作製し、細胞培養支持体から剥離するまでの期間をコンフルエントに達してから28日後としたこと以外は実施例 3 と同様に角膜上皮細胞重層化シートを製造した。得られたシートの収縮率は5%以下であり、1枚の膜として十分に強度のあるものであった。

次に、実施例 3 と同様に得られた角膜上皮細胞重層化シートを角膜上皮組織部
20 を欠損させたウサギに常法に従い移植した。角膜上皮細胞シートを創傷部へ15分間付着させ、その後、メスを用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。移植1日後に患部を観察したところ、角膜上皮細胞シートの眼球への生着性は悪く、患部より脱落しかけていた。

25

実施例 4

市販の3.5cmφ細胞培養用培養皿（ベクトン・ディッキンソン・ラブウェア（Becton Dickinson Labware）社製 ファルコン（FALCON）3001）上に、N-イソプロピルアクリルアミドモノマーを30%

になるようにイソプロピルアルコールに溶解させたものを0.1 ml 塗布した。
0.25 MGyの強度の電子線を照射し、培養皿表面にN-イソプロピルアクリルアミドポリマー（PIPAAm）を固定化した。照射後、イオン交換水により培養皿を洗浄し、残存モノマーおよび培養皿に結合していないPIPAAmを取り除き、クリーンベンチ内で乾燥し、エチレンオキサイドガスで滅菌することで細胞培養支持体材料を得た。基材表面における温度応答性ポリマー量を測定したところ、 $1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 被覆されていることが分かった。

一方、常法により作製しておいた角結膜上皮症モデルの白色家兎から深麻酔下で口腔粘膜組織を採取し、その上皮細胞を得られた細胞培養支持体材料上にて、常法に従って3T3細胞と共に培養した（使用培地：コルネパック（クラボウ（株）製）、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下）。その結果、何れの細胞培養支持体材料上の上皮細胞においても正常に付着し、増殖した。

培養6日後に培養した細胞はコンフルエントの状態となり、さらに7日間培養した細胞の上に直径1.8 cmの円状に切り抜いた直径2.3 cmのポリビニリデンジフルオライド（PVDF）膜から成型したキャリアをかぶせ、培地を静かに吸引し、細胞培養支持体材料ごと 20°C で30分インキュベートし冷却することで低温処理し、細胞培養支持体材料上の細胞もかぶせたキャリアと共に剥離させられた。得られた細胞シートは収縮率5%以下の1枚のシートとして十分に強度を持ったものであった。

本実施例で得られた口腔粘膜細胞シートを角膜上皮組織部が欠損した角結膜上皮症モデルである白色家兎に常法に従い移植した。口腔粘膜細胞シートを創傷部へ15分間付着させ、その後、メスを用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。3週間後、患部を観察したところ、口腔粘膜細胞シートは眼球に良好に生着していた。

実施例 5

本実施例においては、N-イソプロピルアクリルアミドモノマーを35%になるようにイソプロピルアルコールに溶解させた以外は、実施例4と同様の方法を使用して、培養皿表面にN-イソプロピルアクリルアミドポリマー（PIPAAm）

m) を固定化した。この方法で形成した基材表面における温度応答性ポリマー量を測定したところ、 $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 被覆されていることが分かった。

本実施例においても、実施例 4 と同様に、口腔粘膜上皮細胞は細胞培養支持体材料上に正常に付着・増殖し、培養 6 日後に培養した細胞はコンフルエントの状態となった。さらに 7 日間培養した細胞の上に直径 1.8 cm の円状に切り抜いた直径 2.3 cm のポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜から成型したキャリアをかぶせ、培地を静かに吸引し、細胞培養支持体材料ごと 20℃ で 30 分インキュベートし冷却することで低温処理し、細胞培養支持体材料上の細胞もかぶせたキャリアと共に剥離させられた。得られた細胞シートは収縮率 5% 以下の 1 枚のシートとして十分に強度を持ったものであった。

本実施例で得られた口腔粘膜細胞シートを角膜上皮組織部が欠損した角結膜上皮症モデルである白色家兎に常法に従い移植した。口腔粘膜細胞シートを創傷部へ 15 分間付着させ、その後、メスを用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わず、移植後、患部にコンタクトレンズを装着させた。3 週間後、患部を観察したところ、口腔粘膜細胞シートは眼球に良好に生着していた。

実施例 6

実施例 4 の細胞培養支持体材料上で、細胞として深麻酔下の白色家兎皮膚の毛根組織から上皮系幹細胞を常法により採取し、3T3 細胞と共に培養したこと以外は実施例 4 と同様な方法で実施した。その結果、培養支持体材料上の毛根細胞は正常に付着し、増殖した。2 週間培養を行った後、直径 1.5 cm の円状に切り抜いた直径 2.1 cm のポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜から成型したキャリアをかぶせ、培地を静かに吸引し、細胞培養支持体材料ごと 20℃ で 30 分インキュベートし冷却することで、細胞培養支持体材料上の細胞シートをかぶせたキャリアと共に剥離させられた。剥離された重層化シートは収縮率 5% 以下の 1 枚のシートとして十分に強度を持ったものであった。

本実施例で得られた細胞シートを角膜上皮組織部が欠損した角結膜上皮症モデルである白色家兎に常法に従い移植した。毛根細胞シートを創傷部へ 15 分間付

着させ、その後、レーザー光を用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。3週間後、患部を観察したところ、細胞シートは眼球に良好に生着していた。

5 実施例 7

- 実施例 4 の細胞培養支持体材料上で、細胞として深麻酔下の白色家兎皮膚の結膜組織から結膜上皮細胞を常法により採取し、3 T 3 細胞と共に培養したこと以外は実施例 4 と同様な方法で実施した。その結果、培養支持体材料上の結膜上皮細胞は正常に付着し、増殖した。2週間培養を行った後、直径 1.5 cm の円状に切り抜いた直径 2.1 cm のポリビニリデンジフルオライド (P V D F) 膜から成型したキャリアをかぶせ、培地を静かに吸引し、細胞培養支持体材料ごと 20℃ で 30 分インキュベートし冷却することで、細胞培養支持体材料上の細胞シートをかぶせたキャリアと共に剥離させられた。剥離された重層化シートは収縮率 3 % 以下の 1 枚のシートとして十分に強度を持ったものであった。
- 15 本実施例で得られた細胞シートを角膜上皮組織部が欠損した角結膜上皮症モデルである白色家兎に常法に従い移植した。結膜上皮細胞シートを創傷部へ 15 分間付着させ、その後、レーザー光を用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。3週間後、患部を観察したところ、結膜細胞重層化シートは眼球に良好に生着しており、結膜
- 20 からの血管侵入も認められなかった。

比較例 3

- 実施例 4 で口腔粘膜細胞シートを作製し、キャリアを使わずに細胞シートを剥離させ、収縮させること以外は実施例 4 と同様に口腔粘膜細胞シートを製造した。
- 25 その際の収縮率は、38 % であった。

実施例 4 と同様に得られた口腔粘膜細胞シートを角膜上皮組織部を欠損させたウサギに常法に従い移植した。角膜上皮細胞シートを創傷部へ 15 分間付着させ、その後、メスを用いて患部以外のところに重なる細胞シートを切除した。その際、細胞シートと生体側の縫合は行わなかった。移植 1 日後に患部を観察したところ、

口腔粘膜細胞シートの眼球への生着性は悪く、患部より脱落しかけていた。

以上の結果より、本技術によれば、前眼部組織への付着性が良好な角膜上皮代替細胞シートの作成が可能であることがわかった。このことは、治療の簡便化、効率化による患者の負担軽減、さらにこれらの細胞シートが患部を十分に覆い、
5 しっかり付着することから患者本人の痛みも顕著に軽減させられる極めて有効な技術と考えられる。

実施例 8

実施例 3 に示す方法と全く同様な方法でキャリアに密着した角膜上皮細胞重層
10 化シートを作製した。このものを近視治療法として知られるレーシック（LASIK）法における角膜上皮フラップの代替になるものかどうかを検討した。

具体的には、まずウサギ角膜に対しマイクロケラトームによって $160\mu\text{m}$ の厚さで角膜実質層を切断しフラップを作製した後、そのフラップを除去し、さらにエキシマレーザーで角膜実質層を削り取り、表面を整え、最後に本来フラップ
15 を戻す場所に実施例 3 で得られたキャリアに密着した角膜上皮細胞重層化シートを付着させた。レーザー光で患部と同じ大きさに角膜上皮細胞重層化シートを切断し、移植を完了した。縫合は行わなかった。3 週間後、患部を観察したところ、角膜上皮細胞重層化シートは眼球に良好に生着しており、本発明の角膜上皮細胞重層化シートはレーシック法にも有効であると考えた。

20

実施例 9

実施例 3 に示す方法と全く同様な方法でキャリアに密着した角膜上皮細胞重層化シートを作製した。このものを近視治療法として知られるレーゼック（LASEK）法における角膜上皮フラップの代替になるものかどうかを検討した。

具体的には、まずウサギ角膜に対しアルコールを点眼し角膜表面を柔らかくし、マイクロケラトームを使わずに角膜上皮の $50\mu\text{m}$ の厚さで切除してフラップを作製した後、そのフラップを除去し、エキシマレーザーで角膜実質層を削り取り、表面を整え、最後に本来フラップを戻す場所に実施例 3 で得られたキャリアに密着した角膜上皮細胞重層化シートを付着させた。レーザー光で患部と同じ大きさ
25

に角膜上皮細胞重層化シートを切断し、移植を完了した。縫合は行わなかった。
3週間後、患部を観察したところ、角膜上皮細胞重層化シートは眼球に良好に生着しており、本発明の角膜上皮細胞重層化シートはレーゼック法にも有効であると考えた。

- 5 以上の結果より、本技術によれば、前眼部組織への付着性が良好な再生角膜上皮細胞シート、その重層化シートの作成が可能であることがわかった。このことは、治療の簡便化、効率化による患者の負担軽減という点において極めて有効な技術と考えられる。

10

産業上の利用可能性

本発明で得られる角膜上皮形成用細胞シートは生体組織への生着性が極めて高く、すなわち「高付着性」であり、たとえば角膜移植、角膜疾患治療、近視治療等の臨床応用が強く期待される。したがって、本発明は細胞工学、医用工学、などの医学、生物学等の分野における極めて有用な発明である。

15

請求の範囲

1. キャリアに密着させた、角膜上皮形成用細胞シート。
2. 蛋白質分解酵素による処理を施されることなく支持体から剥離され、剥
5 離後の細胞シートの収縮率が20%以下に保たれた、請求項1記載の角膜上皮形
成用細胞シート。
3. 基底膜様蛋白質が80%以上残存されている、請求項1または2に記載
の細胞シート。
4. デスモソーム構造が80%以上残存されている、請求項1～3のいずれ
10 か1項に記載の細胞シート。
5. 前眼部組織の一部或いは全部を損傷もしくは欠損した患部を治療するた
めの、請求項1～4のいずれか1項に記載の角膜上皮形成用細胞シート。
6. 前眼部組織が角膜上皮組織、ボーマン膜、角膜実質組織である、請求項
5に記載の角膜上皮形成用細胞シート。
- 15 7. 剥離する時期が、細胞が支持体表面でコンフルエントになってから21
日以内である、請求項1～6のいずれか1項に記載の角膜上皮形成用細胞シート。
8. 再眼角膜上皮細胞シートまたはその重層化シートである、請求項1～7
のいずれか1項に記載の角膜上皮形成用細胞シート。
- 20 9. 重層化シートが角膜上皮細胞を重層化培養させたものである、請求項8
に記載の角膜上皮形成用細胞シート。
10. 角膜上皮代替細胞シートまたはその重層化シートである、請求項1～
7のいずれか1項に記載の角膜上皮形成用細胞シート。
- 25 11. 角膜上皮代替細胞シートが、口腔粘膜細胞、毛根細胞、結膜上皮細胞
の何れかもしくは2者以上の混合物、或いはこれらと角膜上皮細胞との混合物か
らなる請求項10記載の角膜上皮形成用細胞シート。
12. 重層化シートが口腔粘膜細胞、毛根細胞、結膜上皮細胞の何れかもし
くは2者以上の混合物、或いはこれらと角膜上皮細胞との混合物を重層化培養さ

せたものである、請求項 10 または 11 に記載の角膜上皮形成用細胞シート。

13. 口腔粘膜細胞が頬膜由来のものである、請求項 11 または 12 に記載の角膜上皮形成用細胞シート。

5 14. 治療が角膜上皮形成用細胞シートを患部に対し縫合することなく被覆することを特徴とする、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の角膜上皮形成用細胞シート。

15. 患部に被覆する際、患部の大きさ、形状に沿って切断される、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の角膜上皮形成用細胞シート。

10

16. 水に対する 0～80℃の温度範囲で水和力が変化する温度応答性ポリマーで基材表面を被覆した細胞培養支持体上で角膜上皮形成用細胞を培養し、必要に応じて常法により培養細胞層を重層化させ、その後、

15 (1) 培養液温度を上限臨界溶解温度以上または下限臨界溶解温度以下とし、
(2) 培養した角膜上皮形成用細胞をキャリアに密着させ、
(3) そのままキャリアと共に剥離する
ことを特徴とする、角膜上皮形成用細胞シートの製造方法。

17. 角膜上皮形成用細胞シートが、再眼角膜上皮細胞シート、角膜上皮代替細胞シート、またはそれらいずれかの重層化シートである、請求項 16 記載の
20 角膜上皮形成用細胞シートの製造方法。

18. 細胞培養支持体が膜を利用したセルインサートであることを特徴とする、請求項 16 または 17 に記載の角膜上皮形成用細胞シートの製造方法。

19. 温度応答性ポリマーが、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)である、請求項 16～18 のいずれか 1 項に記載の角膜上皮形成用細胞シートの製
25 造方法。

20. キャリアの形状が中心部を切り抜いたリング状のものであることを特徴とする、請求項 16～19 のいずれか 1 項に記載の角膜上皮形成用細胞シートの製造方法。

21. 剥離が蛋白質分解酵素による処理が施されていない、請求項 16～2

0 のいずれか 1 項記載の角膜上皮形成用細胞シートの製造方法。

2 2. 前眼部組織の一部或いは全部を損傷もしくは欠損した患部に対し、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項記載の角膜上皮形成用細胞シートを移植することを
5 特徴とする治療法。

2 3. 移植が患部に対し縫合することなく被覆することを特徴とする、請求項 2 2 記載の治療法。

2 4. 患部に被覆する際、角膜上皮形成用細胞シートを患部の大きさ、形状に沿って切断することを特徴とする、請求項 2 3 記載の治療法。

10 2 5. 治療対象が、角膜びらん、角膜潰瘍、もしくは両眼性の難治性角結膜疾患であることを特徴とする、請求項 2 2 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の治療法。

2 6. 治療を R K 法、P R K 法、L A S I K 法、もしくは L A S E K 法による屈折矯正により行うことを特徴とする、請求項 2 2 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の治療法。

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L27/38, C12N5/00, 11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L27/38, C12N5/00, 11/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, CAPLUS, EMBASE, BIOSIS(STN), JSTPLUS JMED(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| P,X P,Y | JP 2003-38170 A (Mitsuo OKANO), 12 February, 2003 (12.02.03), Full text (Family: none) | 1-9, 14-21 10-13 |
| Y | WO 2002/010349 A1 (Kabushiki Kaisha Serushido), 07 February, 2002 (07.02.02), Full text (Family: none) | 1-21 |
| Y | Ai KUSHIDA, 'Biomaterial no Kirikudaku Saisei Ikogaku no Sekai Toseki kara Bio Jinkojin e', Igaku no Ayumi, Vol.195, No.3, pages 205 to 206, 21 October, 2000 (21.10.00), (ISSN: 0039-2359) | 1-21 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 April, 2004 (05.04.04)

Date of mailing of the international search report

18 May, 2004 (18.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001274

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | Kushida A. et al., 'Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces.', J.Biomed Mater Res., 2001 January,; 54(1):37-46. | 1-21 |
| Y | Hirose M. et al., 'Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface.', Biomacromolecules., 2000, Fall;1(3):377-81 | 1-21 |
| Y | Koji NISHIDA, 'Johi-Hifu Saisei no Kiso to Rinsho, Kakumaku no Saisei Iryo', Gekkan Medical Science Digest, Vol.28, No.14; Page 577 to 581; 25 December, 2002 (25.12.02), (ISSN:1344-1027) | 1-21 |
| Y | Koji NISHIDA, 'Biomaterial to Atarashii Ganka Iryo Kakumakujohi, Kakumakunaihi no Saisei Iryo', Biomaterial, Vol.20, No.4, pages 259 to 268; 15 July, 2002 (15.07.02), (ISSN:1347-7080) | 1-21 |
| Y | Masayuki YAMATO, 'Saibo Sheet Kogaku no Sosei', Biomaterial, Vol.21, No.1; pages 46 to 52, 15 January, 2003 (15.01.03), (ISSN:1347-7080) | 1-21 |
| Y | JP 2002-331025 A (Minoru UEDA), 19 November, 2002 (19.11.02), Full text (Family: none) | 10-13 |
| A | WO 01/080760 A (TSAI RAY JUI FANG), 01 November, 2001 (01.11.01), Full text & JP 2003-523466 A | 1-21 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001274

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 22-26

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 22 to 26 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/38, C12N5/00, 11/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/38, C12N5/00, 11/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE CAPLUS EMBASE BIOSIS (STN) JSTPLUS JMED (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|---------------------|
| P, X P, Y | JP 2003-38170 A (岡野光夫) 2003.02.12, 全文 (ファミリーなし) | 1-9, 14-21 10-13 |
| Y | WO 2002/010349 A1 (株式会社セルシード) 2002.02.07, 全文 (ファミリーなし) | 1-21 |
| Y | 串田愛, 「バイオマテリアルの切り拓く再生医工学の世界 透析からバイオ人工腎へ」, 医学のあゆみ, VOL. 195 NO. 3; PAGE. 205-206; 2000.10.21, (ISSN: 0039-2359) | 1-21 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.04.2004

国際調査報告の発送日

18.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Kushida A et al, 'Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces.', J Biomed Mater Res. 2001 Jan;54(1):37-46. | 1-21 |
| Y | Hirose M et al. 'Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface.', Biomacromolecules. 2000 Fall;1(3):377-81. | 1-21 |
| Y | 西田幸二, 「上皮・皮膚再生の基礎と臨床 角膜の再生医療」, 月刊メディカル・サイエンス・ダイジェスト, VOL. 28 NO. 14; PAGE. 577-581; 2002.12.25 (ISSN: 1344-1027) | 1-21 |
| Y | 西田幸二, 「バイオマテリアルと新しい眼科医療 角膜上皮, 角膜内皮の再生医療」, バイオマテリアル, VOL. 20 NO. 4; PAGE. 259-268; 2002.07.15 (ISSN: 1347-7080) | 1-21 |
| Y | 大和雅之, 「細胞シート工学の創成」, バイオマテリアル, VOL. 21 NO.1; PAGE. 46-52; 2003.01.15 (ISSN: 1347-7080) | 1-21 |
| Y | J P 2002-331025 A (上田 実) 2002.11.19, 全文 (ファミリーなし) | 10-13 |
| A | WO 01/080760 A (TSAI RAY JUI FANG) 2001.11.01, 全文, & JP 2003-523466 A | 1-21 |

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 22-26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲22-26は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。